

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2002 年 3 月 28 日 (28.03.2002)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 02/25283 A1

(51) 国際特許分類: G01N 33/544, 33/543

(21) 国際出願番号: PCT/JP01/08162

(22) 国際出願日: 2001 年 9 月 20 日 (20.09.2001)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2000-288147 2000 年 9 月 22 日 (22.09.2000) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 和光純  
薬工業株式会社 (WAKO PURE CHEMICAL INDUS-  
TRIES, LTD.) [JP/JP]; 〒540-8605 大阪府大阪市中央  
区道修町三丁目1-2 Osaka (JP).

Masaaki) [JP/JP]. 鈴置 純 (SUZUOKI, Jun) [JP/JP]. 高  
尾英明 (TAKAO, Hideaki) [JP/JP]; 〒661-0963 兵庫県  
尼崎市高田町6番1号 Hyogo (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,  
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,  
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,  
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,  
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO,  
NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR,  
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,  
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM,  
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許  
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,  
LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG,  
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) 発明者; および

添付公開書類:

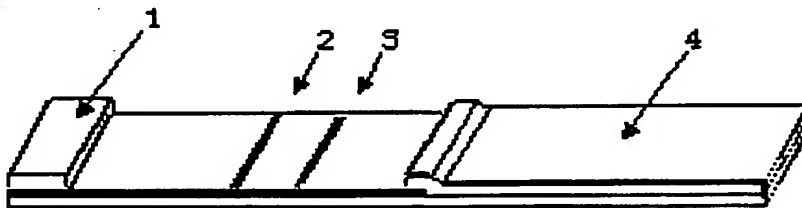
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 木田正章 (KIDA,

— 国際調査報告書

[続葉有]

(54) Title: MEASURING INSTRUMENT FOR IMMUNOCHROMATOGRAPHY

(54) 発明の名称: イムノクロマト法用測定器具



(57) Abstract: A measuring instrument for immunochromatography which comprises a developing membrane and, immobilized thereon, a binding ribosome having a lipid antigen immobilized thereon; and a method for measuring a material to be measured by an immunochromatography using the instrument. The measuring instrument is not an instrument comprising a

developing membrane having a lipid antigen itself immobilized thereon, and thus has a lipid antigen immobilized on a membrane with stability and good efficiency.

(57) 要約:

WO 02/25283 A1

本発明は、脂質抗原そのものを展開膜上に固定化するのではなく、脂質抗原が固定化された結合能リボソームを、展開膜上に固定化することからなる、脂質抗原を安定に且つ効率よく展開膜上に固定化したイムノクロマト測定用器具、及び該器具を用いたイムノクロマト法による測定対象物質の測定方法を提供するものである。



2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

## 明 細 書

## イムノクロマト法用測定器具

## 技術分野

- 5       本発明は、(1) 測定対象物質と結合能を有するリポソーム（以下、結合能リポソームと略記する。）が吸収性担体上に固定化されてなるイムノクロマト法用吸収性担体及びそれを展開膜として用いた測定器具、並びに
- 10       (2) 測定対象物質を含む試料と、標識された測定対象物質と結合能を有する物質（以下、標識測定対象結合物質と略記する。）とを接触させて、当該「測定対象物質」と当該標識測定対象結合物質との「複合体」を形成させ、次いでこの複合体を結合能リポソームと反応させ、生成した複合体中の標識物質に由来する着色に基づいて「測定対象物質」の測定を行うことを特徴とする、イムノクロマト法による試料中の「測定対象物質」の測定方法、更には、(3) (2) の方法により (1) の測定器具
- 15       を用いて「測定対象物質」の測定をおこなう方法に関する。

## 技術背景

- イムノクロマト法は、多孔質膜の毛細管現象を利用したクロマトグラフィーの手法と免疫学的手法を組み合わせた方法であり、迅速且つ簡便
- 20       に、そして特別な装置を用いることなく免疫測定を行える方法であり、各種抗体の検出等に用いられている。

- しかしながら、この方法では展開膜上に抗原を固定化する際、抗原を水溶液に溶解し該水溶液を展開膜に塗布するという作業を必要とするため、水に不溶の脂溶性抗原を展開膜上に固定化することはなされておらず、脂溶性抗原に対する抗体をイムノクロマト法で測定することもなされていなかった。そこで、脂溶性抗原を展開膜に固定化するために、脂
- 25

溶性抗原を有機溶媒に溶解させ、該有機溶媒を展開膜に塗布する試みがなされたが、有機溶媒による吸収性担体の物理的損傷等が起こるため、抗体測定感度が低下したり、抗体特異性が弱まる等の問題があった。そのため、イムノクロマト法を用いて脂溶性抗原に対する抗体等を測定する  
5 ための、脂溶性抗原の展開膜上への有効な固定化方法の開発が望まれていた。

### 発明の開示

本発明は、上記した如き状況に鑑みなされたもので、脂質抗原そのものを展開膜上に固定化するのではなく、脂質抗原が固定化された結合能  
10 リポソームを、展開膜上に固定化することからなる、脂質抗原を安定に且つ効率よく展開膜上に固定化したイムノクロマト測定用器具、及び該器具を用いたイムノクロマト法による測定対象物質の測定方法を提供することにある。

15 本発明は、(1)結合能リポソームが展開膜上に固定化されてなる、イムノクロマト法用吸収性担体、(2)結合能リポソームが展開膜上に固定化されてなる、イムノクロマト法用測定器具、(3)測定対象物質を、展開膜上に固定化された結合能リポソームと反応させることからなる、イムノクロマト法による測定対象物質の測定方法、(4)測定対象物質を含  
20 む試料を、展開膜上に固定化されている結合能リポソーム上に供給し、当該測定対象物質と該リポソームとを反応させることからなる、イムノクロマト法による試料中の測定対象物質の測定方法、(5)測定対象物質を含む試料と、標識測定対象結合物質とを接触させ、当該測定対象物質と当該標識測定対象結合物質との複合体を形成し、次いでこの複合体を  
25 結合能リポソームと反応させ、生成した複合体中の標識物質に由来する着色に基づいて測定対象物質の有無の判定を行う、イムノクロマト法に

## 3.

よる試料中の測定対象物質の測定方法、(6)標識測定対象結合物質が担持された検体標識部、結合能リボソームが固定化された展開膜及び液体吸収部がこの順序で且つお互いに毛細管現象による液体の流通が可能となるように支持体上に形成されたイムノクロマト法用測定器具の、当該  
5 検体標識部に測定対象物質を含む試料を滴下して測定対象物質と標識測定対象結合物質との複合体を形成させ、当該複合体を展開膜上のリボソーム固定部まで展開させて複合体と結合能リボソームとを反応させ、当該固定部において生成した複合体中の標識物質に由来する着色に基づいて測定対象物質の有無の判定を行う、イムノクロマト法による試料中の  
10 測定対象物質の測定方法、に関する。

即ち、本発明者らは、例えば抗リン脂質抗体等の抗脂質抗体を高感度に検出し得る脂質抗原を展開膜上に固定化したイムノクロマト法用試験具を開発すべく鋭意研究を行った結果、脂質抗原そのものを展開膜上に固定化するのではなく、当該脂質抗原とその他の脂質からなるリボソーム  
15 或いはリボソーム外膜上に当該抗原を組み込ませた（固定化した）ものを、展開膜上に固定化することで、脂質抗原を安定に且つ効率よく展開膜上に固定化できることを見出し、更には、これをイムノクロマト法用試験具として用いることにより試料中の抗脂質抗体を高感度に測定し得ることを見出し、本発明を完成するに至った。

20

## 図面の簡単な説明

- 図1は、本発明のキット又は試験用具の一例を示す図である。  
図2は、本発明のキット又は試験用具の一例を示す図である。  
図3は、本発明のキット又は試験用具の一例を示す図である。  
25 図4は、本発明のキット又は試験用具の一例を示す図である。  
図5は、本発明のキット又は試験用具の一例を示す図である。

図6は、本発明の実施例中で用いられた試験用具の例を示す図である。

#### 発明を実施するための最良の形態

本発明に係る測定対象物質としては、抗原抗体反応を誘起し得る物質  
5 であればよく、例えば、血液、血清、血漿、唾液等の生体体液、リンパ球、血球、各種細胞類、尿、糞便等の生体由来の試料中に含まれる蛋白質、ペプチド、核酸、糖鎖、ホルモン、薬物、及び上記したものに対する抗体等が代表的なものとして挙げられる。更に、具体的には例えば $\alpha$ -  
10 フェトプロテイン(AFP)、CA19-9、前立腺特異抗原(PSA)、癌胎児性抗原(CEA)、癌細胞の産生する特殊な糖鎖を有する物質等の癌マーカー、  
例えば免疫グロブリンA(IgA)、免疫グロブリンE(IgE)、免疫グロブリンG(IgG)、 $\beta$ 2-ミクログロブリン、アルブミン、フェリチン等の血清蛋白質、  
例えばC-ペプチド、アンジオテンシンI等のペプチド、例えばアミラーゼ、アルカリホスファターゼ、 $\gamma$ -グルタミルトランスフェラーゼ  
15 ( $\gamma$ -GTP)等の酵素蛋白、例えばルベラウイルス、ヘルペスウイルス、肝炎ウイルス、ATLウイルス、AIDSウイルス等のウイルス、例えば溶血性レンサ球菌、梅毒病原体等の病原体、例えばこれら病原体及びウイルス等のデオキシリボ核酸(DNA)やリボ核酸(RNA)或はこれら核酸を構成する1本鎖ポリヌクレオチド、例えばスギその他の草木の花粉や室内塵  
20 等のアレルゲン、例えばカイロマイクロン、超低密度リポ蛋白質(VLDL)、低比重リポ蛋白質(LDL)、高密度リポ蛋白質(HDL)、超高密度リポ蛋白質(VHDL)等のリポ蛋白質、例えば天然レシチン、ジパルミトイルフォスファチジルコリン(DPPC)、ジミリストイルフォスファチジルコリン(DMPC)、ジステアロイルフォスファチジルコリン(DSPC)、ジオレオ  
25 イルフォスファチジルコリン(DOPC)や、ジホスファチジルグリセロール(カルジオライピン)等のリン脂質、ガングリオシド、ジガラクトシ

ルジグリセリド等の糖脂質等の脂質、例えばトリプシン、プラスミン、セリンプロテアーゼ等のプロテアーゼ、例えばインシュリン、ヒト絨毛性ゴナドトロピン(hCG)、サイロキシシン(T4)、トリヨードサイロニン(T3)、プロラクチン、甲状腺刺激ホルモン(TSH)等のホルモン、例えばジゴキシン、フェニトイン、モルヒネ、ニコチン等の薬物、並びに上記したものに対する抗体等が挙げられるが、中でも、リポ蛋白質やリン脂質、糖脂質等の脂質類又はこれらに対する抗体等が好ましい。尚、これらの測定対象物質を含有する生体由来試料は、直接或いは適当な緩衝液等で希釈又は懸濁させた後、本発明の測定対象物質の測定方法に付される。

- 10 本発明に係る測定対象物質と結合能を有する物質（以下、測定対象結合物質と略記する。）としては、上記した測定対象物質と免疫学的に結合能を有する物質であれば特に限定はされず、例えば上記したものから選ばれた測定対象物質が抗原であれば、該抗原に対する抗体や該抗原に対する抗体中の(Fab')<sub>2</sub>、Fab'、Fab 及びこれらを有する物質等が挙げられ、
- 15 選ばれた測定対象物質が抗体であれば、該抗体に対する抗原や該抗原の抗原決定基を有する物質等が挙げられ、これら測定対象結合物質は、2種以上を適宜選択して用いても良い。尚、結合能リポソームに固定化される測定対象結合物質と標識測定対象結合物質で用いられる測定対象結合物質は、測定対象物質と免疫学的に結合能を有するものであれば、同
- 20 一のものを用いても異なるものを用いてもよい。

本発明に係る結合能リポソームとしては、イムノクロマト法用測定器具に用いることが出来る測定対象物質と免疫学的に結合する性質を有するリポソームであれば何れでもよく、例えば測定対象結合物質である脂質と特定の脂質とを膜構成成分としてなるリポソームでも、特定の脂質

25 を膜構成成分としてなるリポソーム外膜に測定対象結合物質を結合させたものでも、測定対象結合物質を特定の脂質に結合させたものを膜構成

成分としてなるリポソームでも、測定対象結合物質を特定の脂質に結合させたものその他の脂質とを膜構成成分としてなるリポソームでもよい。尚、測定対象結合物質を膜構成成分として含むリポソームを用いる場合、その他の脂質を用いずに測定対象結合物質それ自体をリポソーム化したものを結合能リポソームとして用いてもよい。

ここで用いられるリポソームの主な膜構成成分としての脂質は、リポソームを形成できるものであれば特に限定はされないが、例えば通常のリポソーム調製に於いて膜構成成分として用いられている天然レシチン(例えば、卵黄レシチン、大豆レシチン等)やジパルミトイルフォスファチジルコリン(DPPC), ジミリストイルフォスファチジルコリン(DMPC), ジステアロイルフォスファチジルコリン(DSPC), ジオレオイルフォスファチジルコリン(DOPC), ジパルミトイルフォスファチジルエタノールアミン(DPPE), ジミリストイルフォスファチジルエタノールアミン(DMPE), 卵黄フォスファチジルグリセロール, ジパルミトイルフォスファチジルグリセロール(DPPG), ジミリストイルフォスファチジン酸(DMPA), ジパルミトイルフォスファチジン酸(DPPA), パルミトイルオレオイルフォスファチジルコリン(POPC)等のリン脂質の一種または二種以上、或はこれらとコレステロール類との混合系、或はこれらに更にリポポリサッカライド等を組み合わせたもの等が挙げられ、好ましくは、天然レシチン、ジパルミトイルフォスファチジルコリン(DPPC), ジミリストイルフォスファチジルコリン(DMPC), ジステアロイルフォスファチジルコリン(DSPC), ジオレオイルフォスファチジルコリン(DOPC), コレステロール等、及びこれらを組み合わせたもの等であり、より好ましくは、天然レシチン及びコレステロール、並びにこれらを組み合わせたもの等である。

また、測定対象結合物質である脂質としては、抗原抗体反応を誘起し



得る脂質であればよいが、例えば、天然レシチン、ジパルミトイルフォ  
スファチジルコリン(DPPC)、ジミリストイルフォスファチジルコリン  
(DMPC)、ジステアロイルフォスファチジルコリン(DSPC)、ジオレオイ  
ルフォスファチジルコリン(DOPC)や、カルジオライピン等が挙げられ  
5 る。また、これらを測定対象結合物質として標識測定対象結合物質を調  
製する場合には、例えばコレステロール等の脂質安定化剤を、標識測定  
対象結合物質の調製時に添加することが好ましい。尚、その際の添加量  
としては、反応溶液中の濃度が通常 0.1~50mg/ml、好ましくは 1~5mg  
/ml である。また、このような脂質安定化剤は測定対象結合物質の調製  
10 時に添加してもよく、その場合の濃度は、標識物質と反応させる際の反  
応溶液中の濃度が上記の如くなるようにすればよい。

本発明に係る結合能リポソームの調製方法としては、以下のような方  
法が挙げられる。

#### ①測定対象結合物質である脂質とその他の脂質からなるリポソームの調 15 製方法

先ず上記した通常リポソームを調製する際に用いられる脂質から選択さ  
れた特定の脂質と測定対象結合物質である脂質とを混合する。次いで、  
得られた混合溶液を、自体公知のリポソーム作成方法、例えばボルテッ  
クスイング法、超音波法、界面活性剤除去法、逆相蒸発法(REV法)、エ  
タノール注入法、エーテル注入法、プレーベジクル(Pre-Vesicle)法、フ  
20 レンチプレスエクストルージョン(French Press Extrusion)法、 $Ca^{2+}$   
融合法、アニーリング(Annealing)法、凍結融解融合法、W/O/W エマル  
ジョン法等に従って、リポソーム化する。具体的には、例えば以下の如  
くして行う。即ち、測定対象結合物質である脂質と測定対象結合物質以  
25 外の通常リポソームを調製する際に膜構成成分として用いられる脂質と  
を混合し、該混合溶液中の溶媒を留去・減圧乾固した後、ホウ酸緩衝液

等を添加し、懸濁させ、これを例えば超音波処理する事によりリボソームを調製する。

- ②測定対象結合物質をリボソームに結合させたりリボソームの調製方法自体公知の架橋法（Biochemistry,第 20 巻,4229～4238 頁,1981 年、  
5 J.Biol.Biochem.,第 257 巻,286～288 頁,1982 年等）、脂質活性化法等に準じて行えばよく、例えば上記の通常リボソームを調製する際に用いられる脂質から選ばれた適当な脂質を用いて①と同様の方法により調製されたリボソームと測定対象結合物質を混合させ、リボソーム外膜に測定対象結合物質を共有結合的に結合させる方法、例えば予め測定対象結合物質を結合させた上記から選ばれた脂質を用いて①と同様の方法により  
10 リボソームを調製し、リボソーム外膜に測定対象結合物質を結合させる方法、例えば測定対象結合物質を結合させた上記から選ばれた脂質とさらに別の上記から選ばれた脂質とを混合したものをを用いて①と同様の方法によりリボソームを調製し、リボソーム外膜に測定対象結合物質を結合させる方法等が挙げられる。  
15

上記の方法において、中でも①の測定対象結合物質である脂質を特定のリン脂質のリボソーム内に組み込んだものを用いる方法が、リボソームを容易に調製でき、好ましいものとして挙げられる。

- 本発明に於いて用いられる吸収性担体または展開膜として用いられる  
20 基材は、水その他の液体等の液状物を吸収し、毛管現象を起こしうる性質を有するものであればよく、例えば多孔性のシート状乃至膜状物、フォーム（発泡体）、織布状物、不織布状物、編物状物等が挙げられ、これらには天然、半合成又は合成の繊維状或いはその他の形状の素材を、抄紙、製膜、発泡成型、編製、織製等の常法により成型することにより得  
25 られるもの等が含まれる。これらの素材としては、例えば綿、麻、絹、セルロース、ロックウール、獣毛、ナイロン、ニトロセルロース、セル

ロースアセテート、ガラス繊維、カーボン繊維、ポロン繊維、ポリアミド、アラミド、ポリビニルアルコール、ポリビニルアセテート、レーヨン、ポリエステル、ポリアクリル酸、ポリアクリル酸エステル、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリ塩化ビニル、ポリ塩化ビニリデン等が挙げられ、中でもナイロンが好ましい。尚、これら吸収性担体又は展開膜に用いられる基材に更にアミノ基、カルボキシル基等の官能基を導入した、所謂活性基修飾吸収性担体も本発明の吸収性担体または展開膜に包含される。該吸収性担体または展開膜の形状は、特に限定されないが、矩形乃至方形や円形乃至楕円形が一般的である。

10 本発明に於いて、結合能リポソームを吸収性担体又は展開膜に担持させる方法としては、通常この分野で用いられる方法であればよく、例えば上記した如き吸収性担体又は展開膜に上記した如き結合能リポソームを含有する溶液を、例えば塗布、滴下或いは噴霧等した後、これを乾燥して物理的吸着により担持させる方法、目的の免疫反応に関与しないタンパク質を結合能リポソームと結合させた後、例えば塗布、滴下或いは噴霧等した後、これを乾燥して物理的吸着により担持させる方法、吸収性担体又は展開膜中の例えばアミノ基、カルボキシル基等の官能基を利用して化学的に結合能リポソームを担持させる方法等が挙げられる。

より具体的には、例えば物理的吸着により結合能リポソームをナイロン膜上に担持させる方法としては、先ず例えば上記の如く形成された結合能リポソーム或いはそれを含む適当な溶液を、例えばナイロン膜上に0.1~10mmの幅で塗布し、当該ナイロン膜を風乾させること等により結合能リポソームを展開膜に担持させる。

尚、展開膜上の上記のようにして得られた結合能リポソームが担持された部位に於いて測定対象物質を測定するので、この部位は、いわゆる測定部となる。また、上記のようにして得られた結合能リポソームが担

持された展開膜には、更に数種のその他の測定対象結合物質を同様の方法を繰り返すことにより展開膜上に担持させ、数種の測定対象物質の測定部を設けることが出来る。その際、数種の測定部は相互に重なりを持たないように展開膜上に設置し、第1測定対象物質、第2測定対象物質、  
5 第3測定対象物質等に対応させて、例えば第1測定部、第2測定部、第3測定部等とすればよい。更にまた、上記のように結合能リポソームを担持させる処理を施した吸収性担体又は展開膜には、非特異的な吸着による測定への影響を防止するために、所謂ブロッキング処理を施しておくことが望ましい。このようなブロッキング処理は、通常この分野で行  
10 われる方法、例えば上記した如き展開膜に用いられる基材を例えばアルブミン、グロブリン、カゼイン、ポリビニルアルコール、界面活性剤等のブロッキング剤(但し、測定への影響のないものを選択して使用する。)を含有する適当な緩衝液(例えば pH が 5 ~ 9 程度で、10 ~ 500mM の例えばトリス緩衝液、リン酸緩衝液、ペロナール緩衝液、ホウ酸緩衝液、  
15 グッド緩衝液等)中に適当な時間浸漬した後に乾燥する方法等により行えばよい。

結合能リポソームの吸収性担体への担持量は、使用するリポソームの種類、使用する測定対象結合物質の種類、使用する標識物質の検出限界等により変動するが、展開膜の結合能リポソームが担持される部分の単位面積 (cm<sup>2</sup>) 当たりの担持量として通常 0.01 μg ~ 10mg、好ましくは 0.1 μg ~ 4mg、より好ましくは 1 ~ 800 μg であり、また、測定対象結合物質の量としては、展開膜の結合能リポソームが担持される部分の単位面積 (cm<sup>2</sup>) 当たりの担持量として通常 0.01 μg ~ 5mg、好ましくは 0.1 μg ~ 2mg、より好ましくは 1 ~ 500 μg である。

25 本発明に係る検体標識部として用いられる基材は、標識測定対象結合物質を保持出来るものであり、且つ生体試料等の検体を滴下した後に毛

細管現象による液体の流通等により検体が展開膜へ移行し得るものであればよく、具体的には上記に示した吸収性担体または展開膜のそれらに準じたものであればよい。

本発明に係る標識測定対象結合物質に於いて用いられる標識物質としては、これを測定対象結合物質に標識したものが毛管現象により移動可能なものであればよく、例えばラジオアイソトープ、例えばホースラディッシュペルオキシダーゼ (POD)、アルカリホスファターゼ等の酵素、例えば金コロイド、鉄コロイド、銀コロイド等の金属コロイド、例えばセレンウムコロイド等の非金属コロイド、例えばローダミンB、ローダミンイソチオシアネート、カルボキシルフルオレッセン、フルオレッセンイソチオシアネート (FITC) 等の蛍光色素、例えばクーマシーブリアントブルーR250、メチルオレンジ等の色素、例えばポリスチレン、ポリアクリルアミド等の高分子ポリマーを原料として調製された着色ラテックス等が挙げられる。中でも、例えば金コロイド、セレンウムコロイド、着色ラテックス等の視覚的に検知し得るシグナルが得られる標識物質が好ましく、特に取扱い易さや感度等の点から金コロイドが好ましい。

上記した如き標識物質は、常法により調製されたもの、或いは市販品を用いることができる。具体的には、例えば金コロイドの場合、例えば塩化金酸をクエン酸ナトリウムで還元する方法 [Nature Phys. Sci., vol.241, 20(1973)] 等により調製すればよい。また、金コロイドの粒径は特に限定されないが、通常 5 nm~200nm、好ましくは 10nm~100nm である。

本発明に係る標識測定対象結合物質としては、測定対象物質と結合能を有し且つ蛍光や色素等の標識となるものであればよく、例えば上記した如き測定対象結合物質と上記した如き標識物質を結合させたもの等が挙げられる。

- また、測定対象結合物質と標識物質を結合させる方法としては、通常この分野で用いられる常法、例えば物理的吸着法〔Techniques in Immunocytochemistry, volume 1, p108-133, Academic Press 社、J. Histochem. Cytochem., vol. 25, 1187-1200(1977)、Experientia vol. 31, 1147(1975)等に記載の方法〕、化学的結合法〔特公平 7-107535 号公報、J. Immunol. Methods, vol. 75, 351(1984)、B. B. A., vol. 640, 66(1981)、B. B. R. C., vol. 89, 1114(1979)、J. Immunol. Methods, vol. 22, 165(1984)等に記載の方法〕、標識物質をタンパク質を介して結合させる方法等が挙げられ、用いる標識物質の種類に応じて選択すればよい。
- 10 尚、標識物質として金コロイドを用いる場合には、物理的吸着による方法、金コロイドを目的の免疫反応に関与しないタンパク質に結合させた後、そのタンパク質と、測定対象結合物質とを結合させる方法、目的の免疫反応に関与しないタンパク質と測定対象結合物質とを結合させた後、そのタンパク質と標識物質とを結合させる方法等により行うのが好
- 15 ましく、例えば、金コロイドを目的の免疫反応に関与しないタンパク質に結合させた後、そのタンパク質と、測定対象結合物質とを結合させる方法としては、①金コロイドと、例えばアルブミン、カゼイン等の目的の免疫反応に関与しないタンパク質とを、常法〔Techniques in Immunocytochemistry, volume 1, p108-133, Academic Press 社、J. Histochem. Cytochem., vol. 25, 1187-1200(1977)、Experientia vol. 31, 1147(1975)等に記載の方法〕により結合させた後、例えばスクシンイミド基等の官能基が導入された測定対象結合物質や、例えばN-ヒドロキ
- 20 シスクシンイミド (NHS) 基等の官能基がスパーサーを介して結合した測定対象結合物質の該官能基と、金コロイドに結合したタンパク質のアミノ基とを反応させて結合させる方法、②測定対象結合物質に導入されたアミノ基に例えばm-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスク
- 25

シンイミドエステル (MBS) 等の架橋剤を用いて導入したマレイミド基と、金コロイドに結合したタンパク質のチオール基とを反応させて結合させる方法等が挙げられる。また、目的の免疫反応に関与しないタンパク質と測定対象結合物質とを結合させた後、そのタンパク質と標識物質とを結合させる方法としては、①例えばアルブミン、カゼイン等の目的の免疫反応に関与しないタンパク質と、例えばスクシンイミド基等の官能基が導入された測定対象結合物質や、例えばN-ヒドロキシスクシンイミド (NHS) 等の官能基がスペーサーを介して結合した測定対象結合物質とを反応させて、測定対象結合物質の官能基にタンパク質のアミノ基を結合させる方法や、②測定対象結合物質に導入されたアミノ基に例えばm-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (MBS) 等の架橋剤を用いて導入したマレイミド基と、例えばアルブミン、カゼイン等の目的の免疫反応に関与しないタンパク質のチオール基とを反応させる方法等により得られた結合物と、金コロイドとを、常法 [Techniques in Immunocytochemistry, volume 1, p108-133, Academic Press 社、J. Histochem. Cytochem., vol. 25, 1187-1200(1977)、Experientia vol. 31, 1147(1975)等に記載の方法] により結合させる方法等が挙げられる。

より具体的には、例えば標識物質として金コロイドを、測定対象結合物質としてリン脂質抗原を用いる場合、以下の如くして行えば本発明の標識測定対象結合物質を得ることができる。

① 物理的吸着による方法

先ず、リン脂質抗原液として例えばカルジオライピン (牛心臓由来、シグマ社製) エタノール溶液及びフォスファチジルコリン (卵黄由来、キューピー社製) エタノール溶液を混合し調製する。

次いで、上記で調製したリン脂質抗原溶液に前処理済み金コロイド懸

濁液を添加し、混和する。尚、この際又は上記のリン脂質抗原溶液調製時に、コレステロールを添加することが好ましい。さらに、ブロッキング液〔例えば BSA、スクロースを含む 2-N-モルホリノ-エタンスルホン酸 (MES) 等〕を加え放置した後、遠心分離により金コロイド標識リン脂質抗原を回収する。

## ②タンパク質を介して結合させる方法

リン脂質抗原に炭素鎖を介してアミノ基を導入した合成リン脂質抗原 6 mg を通常 0.1~100mg、好ましくは 0.1~50mg の MBS と反応させ、合成リン脂質抗原中のアミノ基にマレイミド基を導入する。尚、この際コレステロールを添加することが好ましい。次いで、牛血清アルブミン (BSA) 5mg を、2-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]エタンスルホン酸 (HEPES) 緩衝液に溶解し、通常 1~1000  $\mu$ g、好ましくは 10~100  $\mu$ g の N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジリジチオ)プロピオネート (SPDP) と反応させた後、脱塩してピリジリジチオプロピオネート-B S A (PDP-BSA) を得る。これを更に、ジチオスレイトールで還元した後、脱塩してチオール基導入 B S A を得る。これにマレイミド基導入合成リン脂質抗原を反応させた後、ゲル濾過等により未反応の合成リン脂質抗原と B S A を分離し、合成リン脂質抗原-M B S - B S A 複合体を得る。次いで、金コロイドと、金コロイド 1 mg に対して通常 0.5~100  $\mu$ g、好ましくは 1~50  $\mu$ g の合成リン脂質抗原-M B S - B S A 複合体とを、適当な緩衝液中で 5~30 分間室温で反応させた後、例えばポリエチレングリコール等の分散剤を添加した後、遠心分離処理等により目的の金コロイド標識リン脂質抗原を分取する。

尚、上記反応で用いられる緩衝液は、金コロイドと、合成リン脂質抗原との結合反応を阻害しないものであればよい。また、得られた標識測定対象結合物質は、例えばポリエチレングリコール等の分散剤を含有さ



せた溶液中に均一に分散させて保存すればよい。

標識測定対象結合物質と測定対象物質の免疫複合体の生成方法としては、上記の如く生成された標識測定対象結合物質を検体標識部に保持させた後、該検体標識部で生体由来試料と反応させ標識測定対象結合物質  
5 と測定対象物質の免疫複合体を生成させてもよいし、予め試験管等で生体由来試料と標識測定対象結合物質とを反応させ標識測定対象結合物質と測定対象物質の免疫複合体を生成してもよい。

標識測定対象結合物質を検体標識部に保持させる方法は、通常この分野で用いられる毛管現象により移動可能なように保持させる方法であ  
10 りばよく、上記した如き検体標識部を、上記した如き標識測定対象結合物質を含有する溶液中に浸漬後、例えば風乾、送風乾燥又は凍結乾燥等して保持させる方法、上記した如き検体標識部に、上記した如き標識測定対象結合物質を含有する溶液を例えば塗布、滴下或いは噴霧等した後、  
これを風乾、送風乾燥又は凍結乾燥等して保持させる方法等が挙げられ  
15 る。

尚、同時に 2 種類以上の測定対象物質を測定する場合には、上記方法により測定対象結合物質を検体標識部に保持させた後、更に同様の方法を繰り返すことにより各種の測定対象結合物質を検体標識部に保持させられたものを用いることにより行えばよい。

20 また、標識測定対象結合物質の検体標識部への保持量は、使用する抗原又は抗体の種類や検出限界等により変動するが、測定対象結合物質が抗原の場合、吸収性担体の標識測定対象結合物質が保持される部分の単位面積 ( $\text{cm}^2$ ) 当たりの保持量として未標識のものに換算し、通常  $0.05 \sim 200 \mu\text{g}$ 、好ましくは  $0.1 \sim 40 \mu\text{g}$  であり、測定対象結合物質が抗体の  
25 場合は、通常は、 $0.02 \sim 4 \mu\text{g Ab}$ 、好ましくは  $0.1 \sim 0.4 \mu\text{g Ab}$  である。

また、標識測定対象結合物質を保持させる検体標識部は、非特異的な

吸着による測定への影響を防止するために、予め、所謂ブロッキング処理を施しておくことが望ましい。このようなブロッキング処理は、先に述べた方法に準じて行えばよい。

本発明の測定対象物質測定用試験用具は、本発明の測定方法に使用されるものであり、上述した如き結合能リポソームが担持された展開膜を有するものであり、例えば、結合能リポソームが担持された展開膜からなるもの、或いは結合能リポソームが担持された展開膜並びに標識測定対象結合物質が毛管現象により移動可能なように保持されている検体標識部からなり、且つ該展開膜と該検体標識部が毛管現象により移動可能なように形成されたもの等が挙げられる。尚、さらに数種の測定対象物質を同時に測定する場合には、各種の測定対象結合物質や結合能リポソームを互いに重なりを持たないように担持させた複数の検出能を有する展開膜、並びに数種の標識測定対象結合物質が毛管現象により移動可能なように保持されている検体標識部を用いればよい。

本発明の測定対象物質測定用試験用具に於ける好ましい態様としては、  
(a) 標識測定対象結合物質が毛管現象により移動可能なように保持された検体標識部と、(b) 結合能リポソームが担持されている展開膜と、  
(c) 液体吸収部とが、この順序で且つお互いに毛細管現象による液体の流通が可能となるように、支持体上で連結、形成されたもの等が挙げられる。尚、生体由来試料の吸収及び検体標識部での反応を円滑に行わせるために、更に検体標識部の下端に検体滴下部を設け、生体由来試料を先ずこの部分に滴下し、毛管現象を利用して、検体標識部及び測定部に順次これを運ばせて（供給して）反応させるようにしてもよく、また、展開膜は単一のものであっても、複数のものを組み合わせて一体に構成したものであってもよい。

本発明の試験用具の好ましい態様や具体例は上で述べた通りであるが、

その具体例を以下に示す。

本発明の試験用具の態様の一例を図 1 に示す。

尚、図 1 に於いて各数字は夫々以下のものを示す。

1 : 展開膜

5        2 : 結合能リポソーム担持部 (測定部)

また、本発明の試験用具の態様の他の一例を図 2 に示す。

尚、図 2 に於いて各数字は夫々以下のものを示す。

1 : 展開膜

2 : 検体標識部

10       3 : 結合能リポソーム担持部分 (測定部)

また、本発明の試験用具の好ましい態様の一つを図 3 に示す。

尚、図 3 に於いて各数字は夫々以下のものを示す。

1 : 支持体

2 : 検体標識部

15       3 : 展開膜

4 : 結合能リポソーム担持部 (測定部)

5 : 液体吸収部

また、本発明の試験用具の好ましい態様の他の一つを図 4 に示す。

尚、図 4 に於いて各数字は夫々以下のものを示す。

20       1 : 支持体

2 : 検体滴下部

3 : 検体標識部

4 : 展開膜

5 : 結合能リポソーム担持部 (測定部)

25       6 : 液体吸収部

更に、測定対象物質が 2 種以上のもの、例えば、抗リン脂質抗体と梅

毒抗体（抗 TP(Treponema Pallidum)抗体）を測定する場合、例えば第 1 測定対象物質を抗リン脂質抗体、第 2 測定対象物質を梅毒抗体として測定する場合は、第 1 測定部にリン脂質抗原が固定化されたりポソームが、第 2 測定部に梅毒病原体を抗原として用いたもの（以下、梅毒抗原と略記する。）が担持されている展開膜からなるもの、或いは標識されたリン脂質抗原（以下標識リン脂質抗原と略記する）及び標識された梅毒抗原（以下標識梅毒抗原と略記する）が毛管現象により移動可能なように保持されている検体標識部、並びに第 1 測定部にリン脂質抗原が固定化されたりポソームが、第 2 測定部に梅毒抗原が担持されている展開膜とからなり、且つ該検体標識部と該展開膜が毛管現象により移動可能なように結合されているもの等が挙げられる。尚、生体由来試料の吸収及び検体標識部での反応を円滑に行わせるために、更に検体標識部の下端に検体滴下部を、また展開されてくる生体由来試料を効率よく吸収し得るために展開膜上端に液体吸収部を設けてもよい。このようなものの好ましい態様の一つを図 5 に示す。

尚、図 5 に於いて各数字は夫々以下のものを示す。

- 1 : 支持体
- 2 : 検体滴下部
- 3 : 検体標識部（標識リン脂質抗原及び標識梅毒抗原を保持したもの）
- 4 : 展開膜
- 5 : リン脂質抗原が固定されたりポソームの担持部（第 1 測定部）
- 6 : 梅毒抗原担持部（第 2 測定部）
- 7 : 液体吸収部

上記した如き例えば図 4 で示される本発明の試験用具を調製するには、例えば以下の如く行えばよい。

即ち、例えば適当な大きさの支持体上に、上記の如くして作製した結合能リポソームが担持されている測定部を有する展開膜を接着して展開膜を形成する。次いで、上記の如くして作成した検体標識部を展開膜下端と相互に毛管現象が生じるように接着させる。更に、検体標識部下端と相互に毛管現象が生じるように検体滴下部を、また展開膜上端と相互に毛管現象が生じるように液体吸収部を、支持体上に接着させて試験用具を形成する。

また、上記した如き例えば図5で示される本発明の試験用具を調製するには、例えば以下の如くして行えばよい。

10 即ち、先ず、例えば適当な大きさの支持体上に、上記の如くして作製した第一測定部にリン脂質抗原が固定化されたりポソームが、第2測定部に梅毒抗原が担持されている展開膜を接着し、次いで、例えば金コロイド等が結合したリン脂質抗原及び梅毒抗原を保持させた検体標識部を、該展開膜と相互間に毛管現象が生じるように接着させる。更に、検体標識部下端と相互に毛管現象が生じるように検体滴下部を、また展開膜上端と相互に毛管現象が生じるように液体吸収部を、支持体上に接着させて試験用具を形成する。

本発明に係る検体滴下部は、生体由来試料の吸収及び検体標識部での反応を円滑に行わせるためのものであり、検体滴下部と検体標識部とが相互に毛管現象が生じるように接着されてあればよく、より毛管現象を生じやすくするために、約1～2mm程度重なるように接着させればよい。また、その材質は上記した如き展開膜や検体標識部の材質と同じものでよい。

25 本発明に係る液体吸収部は、展開膜より展開されてくる生体由来試料を効率よく吸収し得るためのものであり、液体吸収部と展開膜とが相互に毛管現象が生じるように接着してあればよく、検体滴下部と同様約1

～2 mm 程度重なるように接着させればよい。また、その材質も検体滴下部と同様、上記した如き展開膜や検体標識部の材質と同じものでよい。

本発明に係る支持体としては、例えばポリ塩化ビニル、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリエチレンテレフタレート等の合成  
5 高分子等の材質からなるシート状のものが挙げられる。

本発明に係るイムノクロマト法用試験具全体の大きさとしては、検体滴下部に生体由来試料を例えば滴下等してから毛管現象により展開膜の末端にまで生体由来試料が展開されるまでの時間が、通常 15 分以内、好ましくは 10 分以内となるように設定される。

- 10 本発明の測定対象物質の測定方法は、上記した如き結合能リポソームが担持された展開膜を用いる方法であればよく、特に限定されないが、例えば該展開膜を有するものを用いる方法、或いは該展開膜と、標識測定対象結合物質を保持した検体標識部とを組み合わせたものを用いる方法等が挙げられる。また、2 種以上の測定対象物質を測定する場合にも  
15 用いることができ、例えば第 1 測定対象物質として抗リン脂質抗体を、第 2 測定対象物質として梅毒抗体を用いる場合、リン脂質抗原が固定化されたりポソームと梅毒抗原を担持した展開膜と、標識リン脂質抗原と標識梅毒抗原を保持した検体標識部を組み合わせたものを用いる方法等が挙げられる。

- 20 本発明のより具体的な態様の例を以下に説明する。

①結合能リポソームが担持された展開膜を有するものを用いる場合、例えば以下の如くすればよい。

- 即ち、先ず、生体由来試料と、標識測定対象結合物質とを予め反応させ、標識測定対象結合物質と、生体由来試料中の測定対象物質との複合体を形成させる。次いで、上記の如くして調製された試験用具を用い、  
25 展開膜に該複合体含有溶液を例えば滴下したり、該展開膜を該複合体含

有溶液中に浸漬する等して（尚、当該試験器具に検体滴下部が設けられている場合は、検体滴下部に複合体含有溶液を滴下したり、検体滴下部を複合体含有溶液中に浸漬する等して、ここから毛管現象を利用して測定部を有する展開膜に複合体を供するようにする。）、測定部を有する展開膜に該複合体を供する。次いで、毛管現象により移動した複合体が、測定部の結合能リボソームに捕捉されて生じる複合体（標識測定対象結合物質と、生体由来試料中の測定対象物質と、測定対象結合物質とのサンドイッチ型免疫複合体）中の標識された物質に由来する発色により生体由来試料の測定対象物質を測定する（測定対象物質の有無の判定を行う）。測定対象物質と反応しなかった標識測定対象結合物質は、毛管現象により更に下流に移動する。

尚、生体由来試料と標識測定対象結合物質とを予め反応させた後に、該反応液を展開膜に供することにより測定を行う場合の標識測定対象結合物質の使用量は、測定対象物質又は使用する標識測定対象結合物質の種類や検出限界等により変動するが、測定対象結合物質が抗原の場合、反応時の濃度として未標識の測定対象結合物質量に換算して、通常  $0.1 \mu\text{g/ml} \sim 10\text{mg/ml}$ 、好ましくは  $1 \mu\text{g/ml} \sim 5\text{mg/ml}$ 、より好ましくは  $10 \mu\text{g/ml} \sim 1\text{mg/ml}$  であり、測定対象結合物質が抗体の場合、通常  $1 \sim 100 \mu\text{gAb/ml}$ 、好ましくは  $1 \sim 50 \mu\text{g/ml}$ 、より好ましくは  $1 \sim 10 \mu\text{gAb/ml}$  である。尚、標識測定対象結合物質を含有する溶液としては、通常この分野で用いられている、例えば  $10 \sim 500\text{mM}$  のトリス緩衝液、リン酸緩衝液、ペロナール緩衝液、ホウ酸緩衝液、グッド緩衝液等の緩衝液等が挙げられ、その pH は、抗原抗体反応を抑制しない範囲であればよく、通常  $5 \sim 9$  である。また、このような溶液中には、目的の抗原抗体反応を阻害しないものであれば、例えばアルブミン、グロブリン、水溶性ゼラチン、ポリエチレングリコール等の安定化剤、界面活性剤、糖類等を

含有させておいてもよい。

②結合能リポソームが担持された展開膜と、標識測定対象結合物質を保持した検体標識部とを組み合わせる用いる場合、例えば以下の如くすればよい。

- 5      即ち、先ず、上記の如くして調製された試験用具を用い、検体標識部に生体由来試料を例えば滴下したり、検体標識部を生体由来試料中に浸漬する等して（尚、当該試験用具に検体滴下部が設けられている場合は、検体滴下部に生体由来試料を滴下したり、検体滴下部を生体由来試料中に浸漬する等して、ここから毛管現象を利用して検体標識部に生体由来
- 10    試料を供給するようにする。）、検体標識部に生体由来試料を供給して反応させ、標識測定対象結合物質と、生体由来試料中の測定対象物質との複合体を形成させる。次いで、毛管現象により移動した該複合体が、展開膜の測定対象結合物質担持部分に捕捉されて生じる複合体（標識測定対象結合物質と、生体由来試料中の測定対象物質と、測定対象結合物質
- 15    とのサンドイッチ型免疫複合体）中の標識された物質に由来する発色により生体由来試料の測定対象物質を測定する（有無の判定を行う）。尚、測定対象物質と反応しなかった標識測定対象結合物質は、毛管現象により更に下流に移動する。

- ③また、2種以上の測定対象物質を測定する場合の方法として、例えば
- 20    ば第1測定対象物質として抗リン脂質抗体、第2測定対象物質として梅毒抗体を用いる場合、例えば以下の如くすればよい。

- 即ち、標識リン脂質抗原及び標識梅毒抗原が毛管現象により移動可能なように検体標識部に保持され、且つ該検体標識部が、リン脂質抗原が固定化されたりポソーム及び梅毒抗原が担持された展開膜と、毛管現象
- 25    により移動可能なように結合されている器具を用い、先ず検体標識部に生体由来試料を例えば滴下したり、検体標識部を生体由来試料中に浸漬



する等して（尚、当該試験用具に検体滴下部が設けられている場合は、検体滴下部に生体由来試料を滴下したり、検体滴下部を生体由来試料中に浸漬する等して、ここから毛管現象を利用して検体標識部に生体由来試料を供給するようにする。）、検体標識部に生体由来試料を供給して標識リン脂質抗原及び標識梅毒抗原を生体由来試料と反応させ、標識リン脂質抗原と生体由来試料中の抗リン脂質抗体との反応物である複合体 1 及び標識梅毒抗原と生体由来試料中の梅毒抗体との反応物である複合体 2 を形成させる。次いで、毛管現象により検体標識部から展開膜上のリン脂質抗原が固定化されたりポソームが担持された第 1 測定部に移動した複合体 1 が、展開膜の第 1 測定部に補足されて生じる標識リン脂質抗原と生体由来試料中の抗リン脂質抗体とリン脂質抗原が固定化されたりポソームとの複合体中の標識された物質由来の発色を基に当該試料中の測定対象物質の測定を行う（有無の判定を行う）。更に、毛管現象により展開膜上の梅毒抗原が担持された第 2 測定部に移動した複合体 2 が、展開膜の第 2 測定部に補足されて生じる標識梅毒抗原と生体由来試料と梅毒抗原との複合体中の標識された物質由来の発色をもとに当該試料中の梅毒抗体の測定を行う（有無の判定を行う）。尚、測定対象物質と反応しなかった標識測定対象結合物質は、毛管現象により更に下流に移動する。

尚、上記した如き本発明の方法に於いて、測定とは、標識物質の発色の有無から定性的に物質の有無の判定を行うこと、並びに、標識物質の発色の程度を観察し、その結果を予め作製しておいた標識物質に由来する発色の程度と測定対象物質との関係を表す色調表等に当てはめる等することにより、測定対象物質を定量的に判定すること、更に、発色の程度が特定の色調より薄ければ陰性、濃ければ陽性として、測定対象物質の半定量を行うことを意味する。尚、標識物質の発色の観察は、目視で行なっても、また、例えばプレテスター RM-405、プレテスター

RM-505（何れも和光純薬工業（株）製）等の尿試験紙用のテスター、例えばデンストメーター等を用いて行っても良く、使用する標識物質の種類により適宜選択すればよい。

以下に実施例及び比較例を挙げ、本発明を更に具体的に説明するが、  
5 本発明はこれらにより何等限定されるものではない。

## 实施例

## 实施例 1

### (1) リン脂質抗原の標識方法

10 先ず、リン脂質抗原液として 5mg/ml カルジオライピン（牛心臓由来、シグマ社製）エタノール溶液 2ml、及び 10mg/ml フォスファチジルコリン（卵黄由来、キューピー社製）エタノール溶液 0.5ml を混合したもの（重量比 2 : 1）を調製した。

次いで、調製したリン脂質抗原液 0.25ml に前処理済み金コロイド懸濁液 [平均粒径 35nm、最大吸光度 20.0(以下、 $A_{max}$ =20.0 と表記する) の金コロイド懸濁液] 0.8ml を添加し、室温で 2 時間転倒混和した。さらに、ブロッッキング液 [1 % BSA、2 % スクロースを含む 50mM 2-N-モルホリノ-エタンスルホン酸 (MES)] 30ml を加え 15 分間放置した後、遠心分離 (8000G、15 分間) により金コロイド標識リン脂質抗原を回収した。

## (2) 検体標識部の作製方法

25 先ず、ガラス繊維シートを 0.5%BSA、1%スクロースを含む 25mM リン酸緩衝液で 15 分間マスキングし、さらに 1% ポリ（1-ビニルピロリドン-コ-ビニルアセテート）（BASF 社製、以下、Poly-PA と略記する。）、1%スクロースを含む 25mM リン酸緩衝液で洗浄し乾燥したものを、前処理済みガラス繊維シートとした。

次いで、金コロイド標識リン脂質抗原を  $A_{max}=1.4$  となるように添加した、1% Poly-PA、12%スクロースを含む 50mM MES 溶液を、前処理済みガラス繊維シートに 5mm×200mm 当り 500 $\mu$ l 含浸させ、50℃にて乾燥し、検体標識部を作製した。

### 5 (3) 展開膜作製方法

先ず、5mg/ml カルジオライピン（牛心臓由来、シグマ社製）エタノール溶液 125 $\mu$ l、10mg/ml フォスファチジルコリン（卵黄由来、日本油脂社製）エタノール溶液 250 $\mu$ l 及び 20mg/ml コレステロール（和光純薬工業（株）製）エタノール溶液 125 $\mu$ l からなるリン脂質抗原溶液をエバポレーターを用いて溶媒留去し脂質薄膜を形成させた。次いで、この脂質薄膜を 2 時間真空乾燥した後、100mM ホウ酸緩衝液 500 $\mu$ l を加え懸濁、超音波処理したものをリボソーム懸濁液とした。

該リボソーム懸濁液を所定の膜上に 0.25 $\mu$ l/cm で塗布し 50℃で 5 分間乾燥後、0.5% BSA、2%スクロースを含む 50mM MES 緩衝液で 15 15 分間マスキングし、さらに 1% Poly-PA、2%スクロースを含む 50mM MES 緩衝液にて 2 回洗浄した後、50℃にて 15 分間乾燥し、抗リン脂質抗体検出用展開膜とした。尚、膜としては、市販のナイロン膜を用いた。

### (4) 測定用器具の組立て

両面テープをラミネートしたポリエチレンテレフタレート（PET） 20 のシート（8cm×20cm）の下端より 1.2cm の部位に抗リン脂質抗体検出用展開膜を貼り付け、次いで該展開膜上端に 1mm 重なるように吸収部としてガラス繊維シート（4cm×20cm）を貼り合わせた。さらに、抗リン脂質抗体検出用展開膜下端に 1mm 重なるように検体標識部を貼り、最後に検体滴下部として前処理済みガラス繊維シート（1.2cm×20cm） 25 を PET シート下端に検体標識部と重ねて張り合わせ、各部材をラミネートした該シートを 4mm 幅に切断したものを、抗リン脂質抗体測定用

器具とした。尚、得られた器具はデシケーター内にて室温で保存した。

#### (5) 測定

(4) で作成した測定用器具を用いて検体の測定を行った。測定器具の検体滴下部に検体 50  $\mu$ l を展開し、測定ラインの有無で抗リン脂質抗体の検出を行った。尚、検体として用いた標準血清は、陽性検体として rapid plasma reagin test (以下、R P R 法と略記する。) で 64 倍である梅毒陽性ヒト血清 (Lot:901503-184、国際バイオ) を  $-20^{\circ}\text{C}$  で凍結保存したものを、陰性検体として R P R 法で陰性の正常ヒト血清 (Lot:AX98E0505、積水化学工業) を  $-20^{\circ}\text{C}$  で凍結保存したものをを用いた。

測定は検体滴下 15 分後に目視で判定を行い、同時にデンシトメーター (CS-9300PC、SIMAZU) を用いて測定波長 540nm にて測定した。デンシトメーターによる測定結果を表 1 に示す。

#### 15 参考例 1

上記実施例に於ける (3) 展開膜作製方法を、下記の溶媒を用いた方法で行い、それ以外については実施例 1 と同様に測定器具を組み立て、また同様の測定を行った。その測定結果を併せて表 1 に示す。

##### (1) 溶媒を用いた展開膜作製方法

20 先ず、5mg/ml カルジオライピン (牛心臓由来、シグマ社製) エタノール溶液 125  $\mu$ l、10mg/ml フォスファチジルコリン (卵黄由来、日本油脂社製) エタノール溶液 250  $\mu$ l 及び 20mg/ml コレステロール (和光純薬工業 (株) 製) エタノール溶液 125  $\mu$ l からなるリン脂質抗原溶液をエバポレーターで溶媒留去し脂質薄膜を形成させた。この脂質薄膜を 2 時間真空乾燥後、クロロホルム 500  $\mu$ l を加えて混合し、脂質溶液とした。

該混合脂質溶液を所定の膜上に 0.25  $\mu$ l/cm で塗布し  $50^{\circ}\text{C}$  で 5 分間乾

乾燥した。次いで、0.5% BSA、2% スクロースを含む 50mM MES 緩衝液にて 15 分間マスキングし、さらに 1% Poly-PA、2% スクロースを含む 50mM MES 緩衝液にて 2 回洗浄した後、50℃にて 15 分間乾燥し、抗リン脂質抗体検出用展開膜とした。尚、膜としては市販のナイロン膜を用いた。

表 1

膜	梅毒陽性ヒト血清		正常ヒト血清		S/N 比	
	実施例 1	参考例 1	実施例 1	参考例 1	実施例 1	参考例 1
ナイロン膜	0.142	0.056	0.003	0.019	47.3	2.9

この結果より、リン脂質抗原を組み込んだリポソームを展開膜上に固定化したものを用いる本発明の方法（実施例 1）は、リン脂質抗原を溶解した溶媒を展開膜上に固定化したものを用いた方法（参考例 1）と比較して、梅毒陽性ヒト血清中の抗リン脂質抗体の感度が S/N 比で 15 倍以上よいことが判明した。

## 実施例 2

### (1) TP(Treponema Pallidum)抗原及びリン脂質抗原の標識方法

15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100

まず、TP 抗原 (1.0mg/ml) 8 $\mu$ l を遠心管に分注し、次いで平均粒径 35nm、 $A_{max}=1.2$  の金コロイド懸濁液 5ml を注ぎ室温で 30 分間反応させた後、遠心分離 (8000G、15 分間) して金コロイド標識 TP 抗原を回収した。尚、TP 抗原は、公知のリコンビナント抗原作成法 (Infection and Immunity, volume 54, p500-506, Michael V. Norgard) に従って作成したものを用いた。

リン脂質抗原液としてカルジオライピン (牛心臓由来、シグマ社製) 5mg/ml エタノール溶液、フォスファチジルコリン (卵黄由来、キューピー社製) 10mg/ml エタノール溶液をそれぞれ 2ml、0.5ml (重量比 2 : 1) ずつ混合したものを調製した。

調製したリン脂質抗原液 0.25ml に前処理済み金コロイド懸濁液（平均粒径 35nm、 $A_{max}=20.0$ ）0.8ml を添加し、室温で 2 時間転倒混和した後、ブロッキング液（1 % BSA、2 % スクロースを含む 50mM MES）30ml を加え 15 分間放置し、遠心分離（8000G、15 分間）して金コロイド標識リン脂質抗原を回収した。

### （2）検体標識部の作製方法

まず、ガラス繊維シートを 0.5 % BSA、1 % スクロースを含む 25mM リン酸緩衝液にて 15 分間マスキングし、さらに 1 % Poly-PA、1 % スクロースを含む 25mM リン酸緩衝液で洗浄し乾燥させ、前処理済みガラス繊維シートとした。

次いで、金コロイド標識 TP 抗原を  $A_{max}=1.3$ 、金コロイド標識リン脂質抗原を  $A_{max}=1.4$  となるように添加した、1 % Poly-PA、12 % スクロースを含む 50mM MES を、前処理済みガラス繊維シートに 5mm × 200mm 当り 500  $\mu$ l 含浸させた後、50℃で乾燥し、検体標識部を作製した。

### （3）展開膜作製方法

リコンビナント TP 抗原（1.0mg/ml）40  $\mu$ l、10 % スクロースを含む 250mM リン酸緩衝液 20  $\mu$ l を混合したものを TP 抗原液とした。

また、カルジオライピン（牛心臓由来、シグマ社製）5mg/ml エタノール溶液 125  $\mu$ l、フォスファチジルコリン（卵黄由来、日本油脂社製）10mg/ml エタノール溶液 250  $\mu$ l、コレステロール（和光純薬工業（株）製）20mg/ml エタノール溶液 125  $\mu$ l からなるリン脂質抗原溶液をエバポレーターで溶媒留去し脂質薄膜を形成させた。該脂質薄膜を 2 時間真空乾燥した後、100mM ホウ酸緩衝液 500  $\mu$ l を加え懸濁し、さらに超音波処理したものをリポソーム懸濁液とした。

次いで、TP 抗原液とリポソーム懸濁液を夫々ナイロン膜へ 0.25  $\mu$ l/cm

で塗布し、50℃で5分間乾燥した後、1%BSA、2%スクロースを含む50mM MES 緩衝液で15分間マスキングした。さらに、1%Poly-PA、2%スクロースを含む50mM MES 緩衝液にて2回洗浄した後、50℃で15分間乾燥し、抗TP抗体・抗リン脂質抗体同時検出用展開膜とした。

5 (4) 測定用器具の組立て

両面テープをラミネートしたPETシート(8cm×20cm)の下端より1.2cmの部位に抗TP抗体・抗リン脂質抗体同時検出用展開膜を貼り付け、その展開膜上端に1mm重なるように吸収部としてガラス繊維シート(4cm×20cm)を貼り合わせた。次いで、展開膜下端に1mm重なるように検体標識部を貼り、最後に検体滴下部として前処理済みガラス繊維シート(1.2cm×20cm)をPETシート下端に検体標識部と重ねて張り合わせたシートを4mm幅に切断したものをリン脂質抗体検出用器具とした。模式図を図6に示す。尚、図6に於いて各数字は夫々以下のものを示す。

- 15        1 : 検体滴下部  
          2 : 測定ライン1 (リン脂質抗原が固定化されたりボソーム担持部)  
          3 : 測定ライン2 (TP 抗原担持部)  
          4 : 液体吸収部

また、得られた器具は除湿条件下にて室温で保存した。

20 (5) 測定

① (4) で作成した器具を用いて検体の測定を行った。器具の検体滴下部に検体50μlを展開し、測定ラインの有無で抗TP抗体・抗リン脂質抗体の測定を行った。尚、検体として用いた標準血清は、陽性検体としてRPR法で64倍である梅毒陽性ヒト血清(Lot.901503-184、国際バイオ)を-20℃で凍結保存したものを、陰性検体としてRPR法で陰性の正常ヒト血清(Lot.AX98E0505、積水化学工業)を-20℃で凍結保存

したものを用いた。

②測定は、検体滴下の 15 分後に目視判定で行った。その結果を表 2 に示す。

## 5 参考例 2

ダイナスクリーン TPAb (ダイナボット (株) 製) を用いて、添付文書に従い検体の抗 TP 抗体の検出判定を行った。尚、検体は実施例 2 の (5) で用いたものと同じものを使用した。その判定結果を併せて表 2 に示す。

10

## 参考例 3

RPR テスト三光 (三光純薬 (株) 製) を用いて、添付文書に従い検体の抗リン脂質抗体の検出判定を行った。尚、検体は実施例 2 の (5) で用いたものと同じものを使用した。判定結果を併せて表 2 に示す。

15

表 2

		抗 TP 抗体検出系		抗リン脂質抗体検出系	
		実施例 2	参考例 2	実施例 2	参考例 3
陰性検体	1	—	—	—	—
	2	—	—	—	—
	3	—	—	—	—
	4	—	—	—	—
	5	—	—	—	—
陽性検体	6	+	+	+	+
	7	+	+	+	+
	8	+	+	+	+
	9	+	+	+	+
	10	+	+	+	+

表 2 の結果から、実施例 2 の試験器具を用いることにより TPAb と抗リン脂質抗体とを同時に検出することができ、さらに本発明の方法による結果が従来の方法と相関性があることが判明した。



### 実施例 3

リン脂質抗原の標識を以下の方法で行った以外は実施例 1 と同様に実験を行い、検体の測定を行った。得られた結果を表 3 に示す。

#### 5 (1) リン脂質抗原の標識方法

10 先ず、リン脂質抗原液として 5mg/ml カルジオライピン（牛心臓由来、シグマ社製）エタノール液 1ml、10mg/ml フォスファチジルコリン（卵黄由来、キューピー社製）エタノール液 5ml 及び 20mg/ml コレステロール（和光純薬工業（株）製）エタノール溶液 2.5ml とエタノール 1.5ml を混合したもの（重量比 1:10:10）を調製した。

次いで、調製したリン脂質抗原液 0.5ml に前処理済み金コロイド懸濁液 [平均粒径 35nm、最大吸光度 20.0(以下、 $A_{max}=20.0$  と表記する)の金コロイド懸濁液] 1 ml を添加し、室温で 2 時間転倒混和した。さらに、ブロッッキング液 [1 %BSA、2 %スクロースを含む 50mM 2-N-モルホリ  
15 ノ-エタンスルホン酸 (MES)] 30ml を加え 15 分間放置した後、遠心分離 (8000G、15 分間) により金コロイド標識リン脂質抗原を回収した。

### 参考例 4

20 リン脂質抗原の標識を上記実施例 3 に記載の方法で行った以外は、参考例 1 と同様に測定を行った。その測定結果を実施例 3 と併せて表 3 に示す。

表 3

膜	梅毒陽性ヒト血清		正常ヒト血清		S/N 比	
	実施例 3	参考例 4	実施例 3	参考例 4	実施例 3	参考例 4
ナイロン膜	0.184	0.065	0.003	0.021	61.3	3.0

この結果より、リン脂質抗原を組み込んだリポソームを展開膜上に固定化したものを用いる本発明の方法（実施例 3）は、リン脂質抗原を溶解した溶媒を展開膜上に固定化したものを用いた方法（参考例 3）と比較して、梅毒陽性ヒト血清中の抗リン脂質抗体の感度が S/N 比で 20 倍以上よいことが判明した。また、実施例 3 で得られた S/N 比を実施例 1 で得られたそれと比較すると、実施例 3 の結果の方が良好な値を示し、リン脂質抗原調製時にコレステロールを添加することにより感度が向上することが分かった。

10

#### 実施例 4

TP 抗原及びリン脂質抗原の標識を以下の（1）の方法で行った以外は実施例 2 と同様に実験を行い、検体の測定を行った。尚、得られた結果を表 4 に示す。

#### 15 (1) TP(Treponema Pallidum)抗原及びリン脂質抗原の標識方法

まず、TP 抗原（1.0mg/ml）8 $\mu$ l を遠心管に分注し、次いで平均粒径 35nm、 $A_{max}$ =1.2 の金コロイド懸濁液 5ml を注ぎ室温で 30 分間反応させた後、遠心分離（8000G、15 分間）して金コロイド標識 TP 抗原を回収した。尚、TP 抗原は、公知のリコンビナント抗原作成法（Infection and Immunity, volume 54, p500-506, Michael V. Norgard）に従って作成したものをを用いた。

20

リン脂質抗原液としての 5mg/ml カルジオライピン（牛心臓由来、シグマ社製）エタノール液 1ml 及び 10mg/ml フォスファチジルコリン（卵

黄由来、キューピー社製) エタノール液 5ml、並びに 20mg/ml コレステロール (和光純薬工業 (株) 製) エタノール溶液 2.5ml 及びエタノール 1.5ml を混合したもの (重量比 1:10:10) を調製した。

- 5 調製したリン脂質抗原液 0.5ml に前処理済み金コロイド懸濁液 (平均粒径 35nm、 $A_{max} = 20.0$ ) 1ml を添加し、室温で 2 時間転倒混和した後、ブロッキング液 (1% BSA、2% スクロースを含む 50mM MES) 30ml を加え 15 分間放置し、遠心分離 (8000G、15 分間) して金コロイド標識リン脂質抗原を回収した。

表 4

		抗 TP 抗体検出系		抗リン脂質抗体検出系	
		実施例 4	参考例 2	実施例 4	参考例 3
陰性検体	1	—	—	—	—
	2	—	—	—	—
	3	—	—	—	—
	4	—	—	—	—
	5	—	—	—	—
陽性検体	6	+	+	+	+
	7	+	+	+	+
	8	+	+	+	+
	9	+	+	+	+
	10	+	+	+	+

- 10 表 4 の結果から、実施例 4 の試験器具を用いることにより TPAb と抗リン脂質抗体とを同時に検出することができ、さらに本発明の方法による結果が従来の方法と相関性があることが判明した。

#### 産業上の利用の可能性

- 15 本発明のイムノクロマト法用試験具を用いることで、脂溶性抗原に対す

る抗体をイムノクロマト法により迅速且つ簡便に、そして特別な装置を用いることなく測定を行うことができる。

## 請求の範囲

1. 「測定対象物質と結合能を有するリポソーム」が吸収性担体に固定化されてなる、イムノクロマト法用吸収性担体。
- 5 2. 「測定対象物質と結合能を有するリポソーム」が展開膜上に固定化されてなる、イムノクロマト法用測定器具。
3. 更に標識された「測定対象物質と結合能を有する物質」を保持してなる検体標識部を有する請求項2に記載の測定器具。
4. 更に、支持体及び液体吸収部を有する請求項3に記載の測定器具。
- 10 5. 検体標識部、「測定対象物質と結合能を有するリポソーム」が固定化された展開膜、液体吸収部がこの順序で且つお互いに毛細管現象による液体の流通が可能となるように、支持体上に形成されてなる、請求項4に記載の測定器具。
6. 「測定対象物質と結合能を有するリポソーム」が該展開膜中に存在する官能基によって展開膜上に固定化されてなる請求項5に記載の測定器具。
- 15 7. 「測定対象物質と結合能を有するリポソーム」が、「測定対象物質と結合能を有する物質」が固定化されているリポソームである、請求項6に記載の測定器具。
- 20 8. 「測定対象物質と結合能を有する物質」が、リン脂質抗原である請求項7に記載の測定器具。
9. 「測定対象物質」を含む試料を、展開膜上に固定化されている「測定対象物質と結合能を有するリポソーム」上に供給し、当該「測定対象物質」と該リポソームとを反応させ、「測定対象物質」と「測定対象物質と結合能を有するリポソーム」との複合体を形成させ、当該複合体を測定
- 25 することを特徴とする、イムノクロマト法による試料中「測定対象物質」

の測定方法。

10 10. 「測定対象物質」を含む試料と、標識された「測定対象物質と結合能を有する物質」とを接触させ、当該「測定対象物質」と当該標識された「測定対象物質と結合能を有する物質」との「複合体」を形成し、次  
5 いでこの複合体を、展開膜状に固定化された「測定対象物質と結合能を有するリボソーム」と反応させ、生成した複合体中の標識物質に由来する着色に基づいて「測定対象物質」の測定を行うことを特徴とする、イムノクロマト法による試料中の「測定対象物質」の測定方法。

11. 「測定対象物質と結合能を有するリボソーム」が、「測定対象物質  
10 と結合能を有する物質」が固定化されているリボソームである、請求項10に記載の測定方法。

12. リボソームが展開膜上に当該展開膜中に存在する官能基の作用によって固定化されている請求項11に記載の測定方法。

13. 「測定対象物質」と「測定対象物質と結合能を有する物質」の何れ  
15 か一方が抗原で他方が抗体である請求項12に記載の測定方法。

14. 「測定対象物質」が、抗リン脂質抗体である請求項13に記載の方法。

15. 標識された「測定対象物質と結合能を有する物質」が担持された検体標識部、「測定対象物質と結合能を有するリボソーム」が固定化され  
20 た展開膜及び液体吸収部がこの順序で且つお互いに毛細管現象による液体の流通が可能となるように支持体上に形成されたイムノクロマト法用測定器具の、当該検体標識部に試料を供給して「測定対象物質」と標識された「測定対象物質と結合能を有する物質」との「複合体」を形成させ、当該「複合体」を展開膜上のリボソーム固定部まで展開させて当該  
25 「複合体」と「測定対象物質と結合能を有するリボソーム」とを反応させ、当該固定部において生成した複合体中の標識物質に由来する着色に

基づいて「測定対象物質」の測定を行うことを特徴とする、イムノクロマト法による試料中の「測定対象物質」の測定方法。

1/2

図 1



図 2

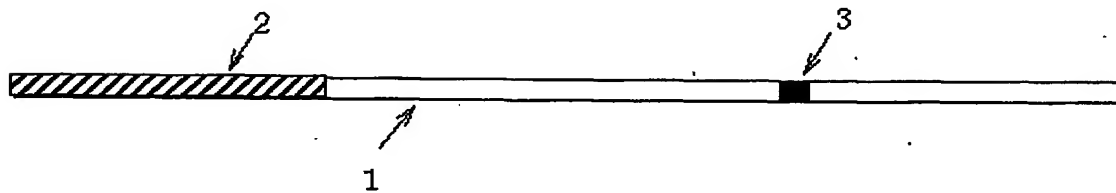
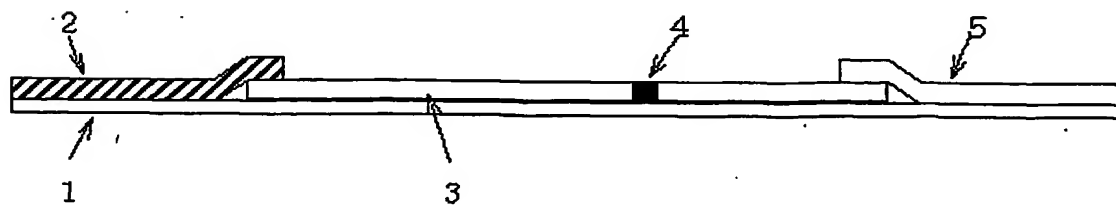


図 3





2 / 2

図 4

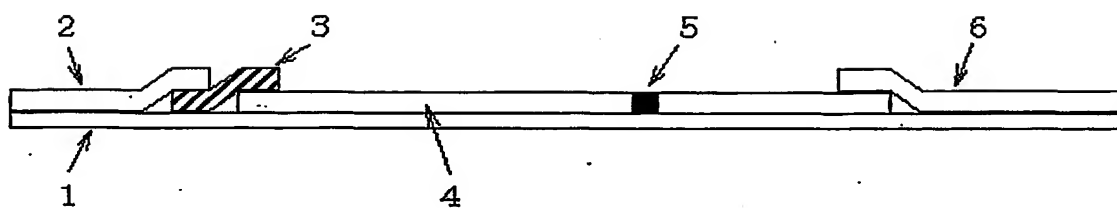


図 5

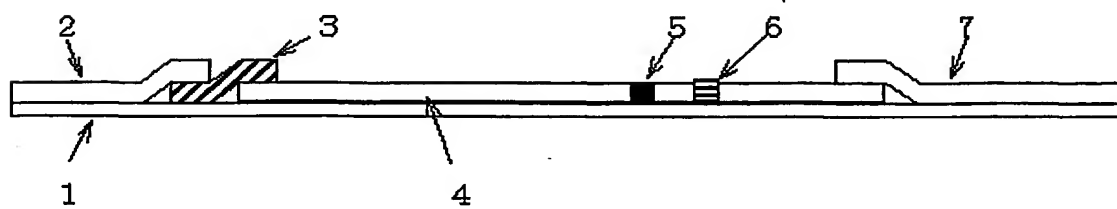
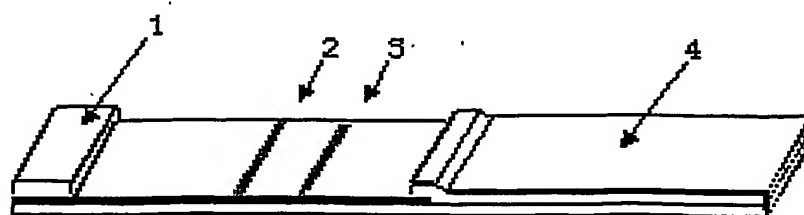


図 6



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/08162

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
Int.Cl<sup>7</sup> G01N33/544, G01N33/543

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> G01N33/544, G01N33/543

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched  
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2001  
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2001 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2001

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
JOIS, BIOSIS

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 6-174712 A (Becton Dickinson & Co.), 24 June, 1994 (24.06.94), & EP 585914 B & AU 659754 B & CA 2105439 A & DE 69312186 E	1-15
A	JP 61-269070 A (Nitsusui Seiyaku K.K.), 28 November, 1986 (28.11.86), (Family: none)	1-15
EA	JP 11-264822 A (Toshiba Corporation), 28 September, 1999 (28.09.99), (Family: none)	1-15

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
13 December, 2001 (13.12.01)

Date of mailing of the international search report  
25 December, 2001 (25.12.01)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int Cl<sup>7</sup> G01N33/544 G01N33/543

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int Cl<sup>7</sup> G01N33/544 G01N33/543

## 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-1996年  
 日本国公開実用新案公報 1971-2001年  
 日本国登録実用新案公報 1994-2001年  
 日本国実用新案登録公報 1996-2001年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)  
 JOIS, BIOSIS

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 6-174712 A(ベクトン・ディッキンソン・アンド・カンパニー), 24. 6月. 1994(24. 06. 94), & EP 585914 B & AU 659754 B & CA 2105439 A & DE 69312186 E	1-15
A	JP 61-269070 A(日水製薬株式会社), 28. 11月. 1986(28. 11. 86), (ファミリーなし)	1-15
EA	JP 11-264822 A(株式会社東芝), 28. 9月. 1999(28. 09. 99), (ファミリーなし)	1-15

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
 「O」口頭による開示、使用、展示等に関する文献  
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

13. 12. 01

国際調査報告の発送日

25.12.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)  
 郵便番号 100-8915  
 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

宮澤 浩



2 J

9407

電話番号 03-3581-1101 内線 3252